Formosan Entomologist
Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

【Research report】

臺灣家蠶核多角體病毒去氧核醣核酸之分析與基因庫之建立【研究報告】

馬士雯1、侯豐男1、陳楊文1、胡念台2

*通訊作者E-mail :

Received: Accepted: 1988/03/20 Available online: 1988/09/01

Abstract

摘要

自臺灣罹病家蠶體中分離及純化之家蠶核多角體病毒 (BmNPV)，所含之DNA，以不同種限制 切割後，以洋菜膠電泳分析，估算其DNA大小，得知該病毒DNA之分子量約為120kb左右。 將純化之BmNPV DNA，利用加熱方式，觀察其雙股DNA，在裂解成為單股DNA過程中，吸光值在波長260 nm 之變化。相對吸光值隨溫度之增加，呈現典型之S型上升曲線，由此曲線測得 Tm (melting temperature) 約為 71.3C，換算得GC 總含量約為 42.5%，而其增色性 (hyperchromicity) 約為37.02%，此病毒具有一多角體蛋白基因 (polyhedrin gene)，以高效率合成病毒之多角體蛋白，適合作為遺傳工程上異源蛋白合成時之載體 (vector)。為尋找此基因，首先將完整之病毒DNA，以限制 Sau 3 AI 切割，分別插到噬菌體載體 EMBL3內，藉不同噬菌體來保存所有病毒DNA，此不同重組噬菌體即組成BmNPV基因庫 (genomic bank)。以本實驗所用噬菌體載體之容量與BmNPV DNA之分子量計算得知，218株重組噬菌體中涵蓋病毒所有基因之機率遠超過99.99%，故可從中篩選多角體蛋白基因。以日本病蠶體中分離出之BmNPV 多角體蛋白基因為DNA探子，在低鹽高溫沖洗情形下，自上述臺灣BmNPV 基因庫共篩選到4株重組噬菌體，可能含有多角體蛋白基因，其中一株經分析顯示極可能含有完整之多角體蛋白基因，將可作為多角體蛋白基因進一步之選殖 (cloning)，並提供表現載體構築之材料。

Key words:
關鍵詞:

Full Text: PDF(9.93 MB)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: http://entsocjournal.yabee.com.tw

中華昆蟲 8: 73-80 (1988)
Chinese J. Entomol. 8: 73-80 (1988)

臺灣家蠶核多角體病毒去氧核醣核酸之分析與基因庫之建立

馬士雯[1] 侯豐男[1] 陳楊文[1] 胡念台[2]

國立中興大學昆蟲學研究所[1] 及
國立中興大學遺傳工程中心[2]

（接受日期：民國77年3月20日）

摘　　要

自臺灣罹病家蠶體中分離及純化之家蠶核多角體病毒 (BmNPV)，所含之 DNA，以不同種限制酶切割後，以洋菜膠電泳分析，估算其 DNA 大小，得知該病毒 DNA 之分子量約爲 120 kb 左右。

將純化之 BmNPV DNA，利用加熱方式，觀察其雙股 DNA，在裂解成爲單股 DNA 過程中，吸光值在波長 260 nm 之變化。相對吸光值隨溫度之增加，呈現典型之 S 型上升曲線，由此曲線測得 Tm (melting temperature) 約爲 71.3 C，換算得 GC 總含量約爲 42.5%，而其增色性 (hyperchromicity) 約爲 37.02%，此病毒具有一多角體蛋白基因 (polyhedrin gene)，以高效率合成病毒之多角體蛋白，適合作爲遺傳工程上異源蛋白合成時之載體 (vector)。爲尋找此基因，首先將完整之病毒 DNA，以限制酶 Sau 3 AI 切割，分別挿到噬菌體載體 EMBL3 內，藉不同噬菌體來保存所有病毒 DNA，此不同重組噬菌體即組成 BmNPV 基因庫 (genomic bank)。以本實驗所用噬菌體載體之容量與 BmNPV DNA 之分子量計算得知，218 株重組噬菌體中涵蓋病毒所有基因之機率遠超過 99.99%，故可從中篩選多角體蛋白基因。以日本病蠶體中分離出之 BmNPV 多角體蛋白基因爲 DNA 探子，在低鹽高溫沖洗情形下，自上述臺灣 BmNPV 基因庫共篩選到 4 株重組噬菌體，可能含有多角體蛋白基因，其中一株經分析顯示極可能含有完整之多角體蛋白基因，將可作爲多角體蛋白基因進一步之選殖 (cloning)，並提供表現載體構築之材料。

緒　　論

家蠶 (*Bombyx mori* L.) 核多角體病毒 (BmNPV) 可引起家蠶膿病 (jaundice)，爲其嚴重疾病之一（陳及侯，1980）。有關臺灣 BmNPV 與家蠶之間病理學及檢定之研究，已有多篇（陳及侯，1980; Chen and Hou, 1980; Hou and Chao, 1980; Liu and Hou, 1983）。至於病毒核酸 (nucleic acids) 之研究，進展甚快，早期 Onodera *et al.* (1965) 採用離心和電子顯微鏡觀察 BmNPV 的核酸構造，近年來則多採用限制酶 (restriction endonuclease) 切斷 DNA 後，再分析病毒基因羣之結構 (McCarthy *et al.*, 1978; Smith and Summers, 1979)。在日本 Maeda *et al.* (1984) 並已成功地利用 BmNPV 作爲表現載體 (expression vector)，大量合成具生物活性之人體 α-干擾素 (α-interferon)。臺灣分離之 BmNPV 以及其他昆蟲病毒，這方面的研究，迄今尚無資

料。本文旨在探討發生在臺灣之 BmNPV 之基因核酸特性，並以噬菌體載體 EMBL3 建立完整之基因庫，以供選殖多角體蛋白基因之用。

材料與方法

一、供試昆蟲及病毒

供試家蠶（*B. mori*）係由臺灣省農林廳蠶業改良場提供之蠶卵或幼蟲，以桑葉在 27±1 C 下飼養至適齡蟲期。BmNPV 係本研究室自發病蠶體分離所得之病毒源。

二、病毒之純化

依 Summers and Smith (1975, 1976, 1978) 及 Maskos and Miltenburger (1981) 的方法，依其步驟作部份修改如下：病蠶以 0.01 M Tris (pH 7.8), 0.001 M EDTA 及 1% 2-mercapto-ethanol 緩衝液，打碎後用紗布過濾，再以 polytron 攪拌，在 4 C 下，4,500 rpm 離心 40 分鐘，下層加入 0.04 M Tris, 0.02 M CH_3COONa 及 0.1% SDS 之十倍稀釋緩衝液 (pH 7.3)，用 8,500 rpm 離心 30 分鐘沉澱物用 10～80% 蔗糖梯度，在 Beckman L5-40 超高速離心機 (SW 40 Ti rotor), 24,000 rpm (約 70,000×g) 離心 30 分鐘，可得核多角體病毒 (NPV) 多角體沉澱環，多角體取出後在 4 C 下貯存備用。病毒粒子 (virion) 之純化係參考 Kobayashi and Nakagaki (1984) 方法，將 40 mg 多角體粉末溶於 4 ml 蒸餾水，加入等積之 50 mM Na_2CO_3 在 0 C 下攪拌 15 分鐘，再在 30～60% (w/v) 蔗糖梯度溶液上，以約 80,000×g 離心 1 小時。吸取病毒粒子沉澱帶，再以蒸餾水水洗後，用 130,000×g 離心 30 分鐘形成沉澱帶，取出以緩衝液懸浮在 4 C 保存供 DNA 抽出取用。

三、病毒核酸之抽取及限制酶處理

依 Smith and Summers (1979) 方法，在病毒粒子中加入 SDS 及 proteinase K，使其最終濃度分別爲 0.1%及 0.5 mg/ml，置於 37C 水浴內 2 小時，將此溶液加入等體積經 Tris 緩衝液飽和的酚 (phenol) (Maniatis *et al.*, 1982)，經用 3,000×g 離心 10 分鐘後，取水層，再加入等體積的 phenol: chloroform (1:1)，離心後，取水層，再加入等體積的 chloroform: isoamyl alcohol (24:1)；離心後將水層以 0.1×SSC (1×SSC: 15 mM sodium citrate+150 mM NaCl, pH 7.5) 透析 36 小時以上。

選用適用之限制酶 10～15 units 與 2 μg 病毒 DNA，於 37 C 反應 5～8 小時後，以含 50% 甘油，0.25% bromophenol blue 之電泳樣品液 (Maniatis *et al.*, 1982) 中止酵素反應，並以 lambda DNA 用 Hind III 處理，提供電泳分離 DNA 之標準分子量。電泳結束後，於 50 μg/ml 之 ethidium bromide 染色，於紫外燈下觀察，對標準分子量 DNA 泳動距離，換算病毒 DNA 之分子量 (Southern, 1979)。

四、病毒 DNA 之 Tm 值測定法

純化之 DNA 於 OD_{260} 下測定其吸光值，計算 DNA 之濃度 (1 OD_{260}=50 mg/ml DNA)。取 20 μg BmNPV DNA，溶於 100 μℓ 0.1×SSC (SSC = 150 mM NaCl, 15 mM Sodium citrate) 中，以 Beckman spectrophotometer Du-8 型 Tm analysis system 之程式測定，設定波長 260 nm，控制每分鐘加熱 1 C，觀察其 OD 值之改變。

五、重組噬菌體之製備

以噬菌體 EMBL3 DNA 爲載體，經限制酶 Bam HI 與 Eco RI 切割，插入經 Sau 3 AI 部

分切割所得適當大小 (9～12 kb) 之 BmNPV DNA，形成重組 DNA，進而作試管中包裝 (in vitro packaging) (Maniatis *et al.*, 1982)，作成重組噬菌體。將此重組噬菌體感染大腸菌 NM 539 (Frischauf *et al.*, 1983) 即可選到含有不同 BmNPV 片段之重組噬菌體溶菌斑。

培養大量之大腸菌 MM 538，以 M.O.I.=0.01 狀況下感染，(M.O.I. 即 multiplicity of infection，亦即噬菌體個數/菌數)，在 37 C 下，240 rpm 振盪培養 16 小時，收集此上清液 (lysate) 即含有大量噬菌體。隨後以 10% PEG 6000, 1 M NaCl 水浴 1 小時沉澱 lysate，繼以梯度離心 (不同密度 CsCl)，進行高速離心 (20,000 rpm，2 小時)，收集純化之 EMBL3 噬菌體，繼以 1×SSC 透析後，在 37 C 下以 1 mg/ml proteinase K 處理，抽取 EMBL3 DNA 作爲載體 DNA 之用。

上述所得來 EMBL3 DNA，經由限制酶 Eco RI 及 Bam HI 切割完全後，所得之 DNA，即可供作載體之用。

六、BmNPV DNA 片段之製備

BmNPV DNA 以限制酶 Sau 3 AI，於 37 C 下，進行部分切割，所得之 9-23 kb BmNPV DNA，經小牛腸內鹼性磷脂酶 37 C 處理 30 分鐘，進行去磷脂反應 (dephosphorylation) (Chaconas and Van de Sande, 1980)。

七、銜接反應 (ligation)

上述處理之 EMBL3 DNA 及 BmNPV DNA，以 3:1 之莫耳濃度 (molar ratio) 於試管中，10 $\mu\ell$ 體積下，加入 1 unit 之 T_4 DNA 銜接酶，於 4 C，反應 16 小時，即可得重組噬菌體。

八、試管中包裝 (in vitro packaging)

將所得之重組噬菌體 DNA，加入包裝萃取物，經 22 C，2 小時反應後，加入 100 $\mu\ell$ 緩衝溶液 (0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl pH 7.9, 0.01 M $MgSO_4$)，即完成試管中包裝，可得重組噬菌體。

九、重組噬菌體之繁殖 (amplification) 與定量 (titre)

將上述所得之重組噬菌體，感染大腸菌 (*E. coli*) NM 539 (Frischauf *et al.*, 1983)，靜置於 37 C, 15 分鐘，加入 3 毫升預熔之上層凝膠 (top agar)，混合均勻，倒入含有底層凝膠 (bottom agar) 之培養皿中，在 37 C 隔夜培養所得每一溶菌斑係同一重組噬菌體繁衍之結果，所有溶菌斑之集合即構成 BmNPV 之基因庫。

十、多角體蛋白基因探子之製備

取自日本 AcNPV 多角體蛋白基因之 10.5 kb EcoRI DNA 片段 (鳥取大學前田進博士提供)，約 200 ng 經缺口轉移 (nick translation) (Maniatis *et al.*, 1982)，以 biotin-11-dUTP 標識之 (Leary *et al.*, 1983)，即可作爲探子。

十一、溶菌斑互交法 (plaque hybridization)

以 Nitrocellulose paper 轉印培養皿上之重組噬菌體。利用 0.5 M NaOH 打破噬菌體蛋白外殼，使其內之 DNA 裸露，並將之裂解爲單股，經眞空高溫處理後與前述多角體蛋白基因探子作互交反應。互交反應後與其後之冲洗情況係依 biotin 廠商提供之方法，呈色反應則根據 (Leary *et al.*, 1983) 之方法。

結 果 與 討 論

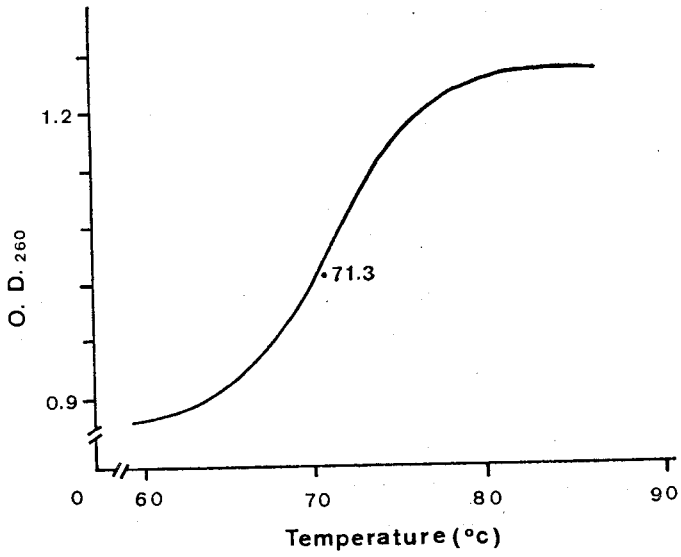
一、臺灣 BmNPV DNA 之 Tm 值與 GC 含量

以加熱方式分析臺灣 BmNPV DNA 裂解單股 DNA 之過程，在 0.1×SSC 溶液中，波長 260 nm 相對吸光值隨溫度增加而上升之曲線顯示，根據 Mandel and Marmur (1968) 所建立 GC 與 Tm 之線性關係，圖一顯示，BmNPV DNA 裂解過程中，臺灣 BmNPV DNA 之 GC 含量約爲 42.5%。由於 Onodera *et al.* (1965) 所測定 BmNPV DNA 之 Tm 值爲 86～87 C，證明臺灣 BmNPV 與其他地區家蠶病毒 DNA 之 GC 含量很類似。波長 260 nm 相對吸光值，從 65 C 至 79 C 之間上升至 1.232。推算其增色性 (hyperchromicity) 爲 37.02%，與 Jurkovicova *et al.* (1979) 所測得之增色性 37～39%相仿。Mandel and Marmur (1968) 以吸光值增色性 40% 左右，代表 DNA 純度較佳，因此本試驗所得之 BmNPV DNA 純度甚高，可能含寄主細胞 DNA 之含量不高。

二、臺灣 BmNPV DNA 之限制酶分析

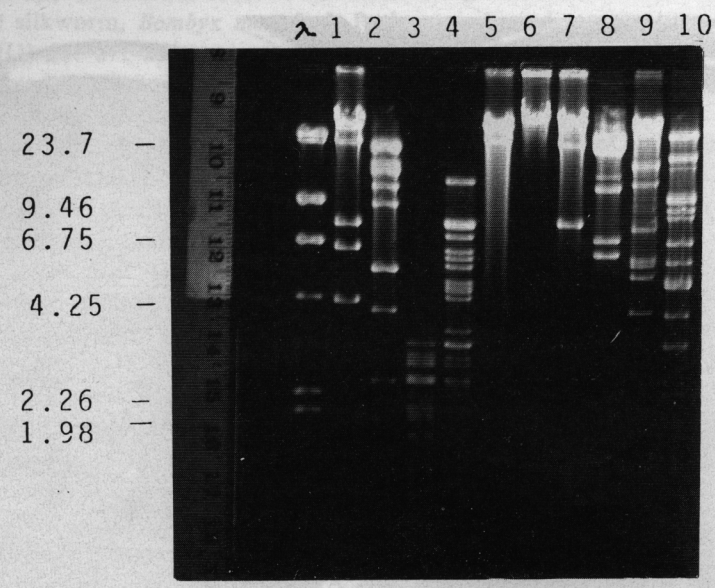
BmNPV DNA 以不同限制酶切割，繼以電泳膠依切割 DNA 片段大小分析。由圖二電泳圖之結果觀察，臺灣 BmNPV DNA 被 Bam HI 切出至少 6 個片段，大小分佈在 4 kb 到 40 kb 之間。Eco RI, Hinc II, Hpa I, Hind III 切割之結果顯示，此 BmNPV DNA 皆具有多處之切割位置。估計臺灣 BmNPV DNA 大小時，採用切割之 DNA 片段，以介於標準分子量 DNA 片段大小在 1.98 kb 至 23.7 kb 之間，較爲準確，由 Southern (1979) 公式計算諸片段大小，估得臺灣 BmNPV DNA 之分子量約爲 120 kb 左右。

據 Smith and Summers (1982) 指出在病理學上研究得知，BmNPV 具有寄主專一性，只感染 *B. mori*，與 *Autographa californica* NPV (AcNPV), *Heliothis zea* NPV (HzNPV) 所感染之寄主完全不同，早期實驗顯示此三種病毒，同屬桿狀病毒屬 (*Baculovirus*)。他們利用限制酶切割型式可以區分上述三種病毒，進一步提供病毒分類之標準。由圖二限制酶切割結果顯示，臺灣



圖一 家蠶核多角體病毒 DNA 之融解曲線。

Fig. 1. Melting curve of BmNPV DNA at OD_{260} wave length.



圖二 家蠶核多角體病毒限制酶消化之電泳圖。

Fig. 2. Gel electrophoresis pattern of BmNPV DNA digested with restrcition enzymes (0.6% agarose).
λ: λDNA/Hind III
1: Bam HI 2: Eco RI 3: Hinc II 4: Hpa I 5: Kpn I
6: Sa lI 7: Sma I 8: Stu I 9: Xho I 10: Hind III

BmNPV 與已發表之 AcNPV 與 HzNPV 在許多種限制酶切割上有較大之差異（Miller and Dawes, 1978; Knell and Summers, 1984），但與 Smith and Summers (1982) 的結果吻合。

三、臺灣 BmNPV 基因庫之建立

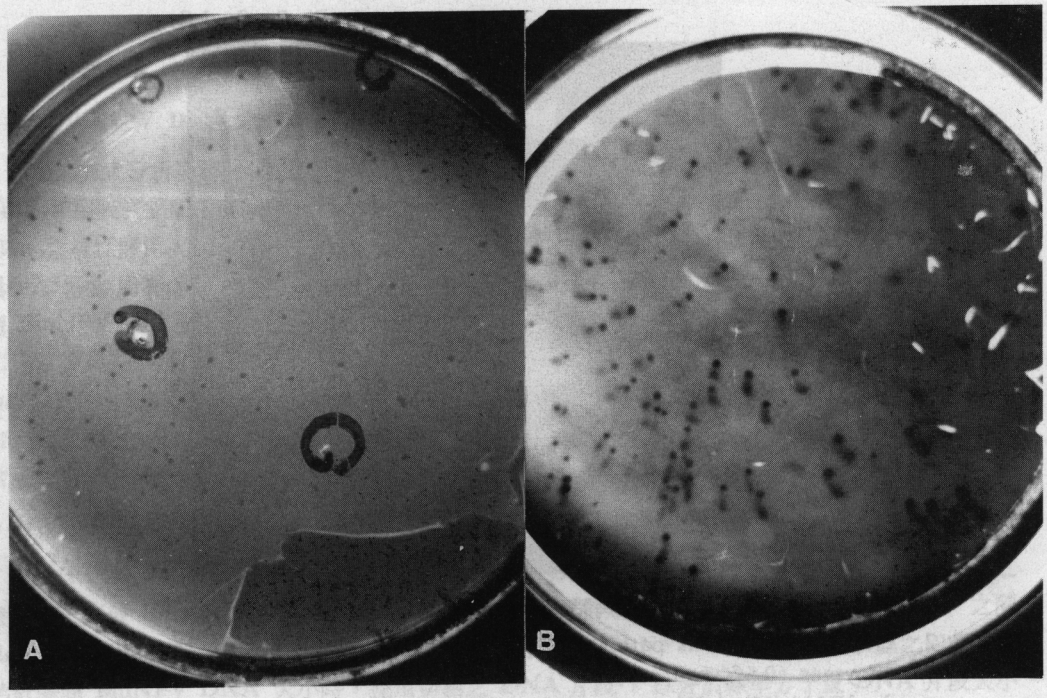
BmNPV DNA 以 Sau 3 AI 限制酶部分切割後，所產生之 9～23 kb 大小片段，與噬菌體 EMBL3 DNA 進行銜接反應，及試管中包裝。由實驗得到 218 株重組噬菌體。依照 Clark and Carbon (1976) 公式，以 EMBL3 爲載體之重組噬菌體，每株約可容納 20 kb 插入 DNA，全長約 120 kb 之 BmNPV DNA，包含在此基因庫中之涵蓋率若要達 99.99%，至少需要 51 株重組噬菌體，本實驗得到重組噬菌體達 218 株，顯示其涵蓋率遠超過 99.99%。

四、重組噬菌體之篩選

以日本 BmNPV 多角體蛋白基因（約 1.8 kb）的 Hind III-Hpa I DNA 片段爲探子，自上述臺灣 BmNPV 基因庫中，選出含有多角體蛋白基因之重組噬菌體共 4 株（圖三）。取其中 1 株命名爲 λ NPV 1，經第二次以探子互交，證實無誤。抽取大量 DNA，作多角體蛋白基因限制酶之電泳圖（圖二），結果與已發表之日本 BmNPV 多角體蛋白基因 (Maeda *et al.*, 1985) 無甚差異。

綜合以上結果，本試驗由臺灣病蠶中分離及純化 NPV，並自其中抽取 DNA，建立臺灣 Bm NPV 之基因庫，以此基因庫爲基礎，本試驗以日本 BmNPV 核多角體蛋白基因爲探子，順利地選殖到臺灣 BmNPV 之核多角體蛋白基因，說明此基因庫可提供未來純化臺灣 BmNPV 其他基因之材料。其次選殖到臺灣 BmNPV 核多角蛋白基因，將爲核多角蛋白啓動子爲啓動子之表現質體之構築，奠定基礎。

根據初步利用限制酶切割結果，顯示臺灣 BmNPV 核多角體蛋白基因與日本 BmNPV 爲同一基



圖三 家蠶核多角體病毒基因羣儲庫之建立。

Fig. 3. Construction of BmNPV genomic bank using total BmNPV as probe labelled with biotin and screened by plaque hybridization.
A : recombinant phage in *E. coli* NM539
B : clones of phage EMBL3 containing BmNPV DNA
* Four markers at the Fig. 3A is the recombinant phages containing the polyhedrin gene of Taiwan BmNPV.

因，無甚差別。然而臺灣 BmNPV 與日本 BmNPV 整個基因體作限制酶切割比較時，有少數差異出現（馬士雯、侯豐男、胡念臺，未發表資料），此項結果是否說明核多角體蛋白基因來自不同地區之 BmNPV，其差異較其他基因小，尚有待臺灣 BmNPV 核多角體蛋白基因之鹽基定序後，方可決定。

誌 謝

本文承行政院國家科學委員會專題研究計畫編號 NSC75-0409-B005-31 及 NSC76-0409-B005-05經費補助，臺灣省蠶業改良場提供蠶種及日本鳥取大學前田進博士惠贈 BmNPV 多角體蛋白基因探針，在此一併誌謝。

參 考 文 獻

陳瑞山、侯豐男 1980 本省家蠶核多角體病毒組織病理學之研究 科學發展月刊 8(4): 329-337。

Chaconas, G. and J. H. Van de Sande. 1980. 5′-^{32}P labelling of RNA and DNA restriction fragments. *In*: "Methods in Enzymology" (Grossman, L. and K. Moldave, eds.), Vol. 65, Part I, pp. 75-85. Academic Press, N. Y.

Chen, R. S. and R. F. Hou. 1980. Factors affecting infection of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori* L. I. Pathogenicity and temperature. Bull. Soc. Entomol. (NCHU) 15: 271-284.

Clarke, L. and J. Carbon. 1976. A colony bank containing synthetic CoEl hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. Cell 9: 91-99.

Frischauf, M., L. Lehrach, A. Poustka and N. Marray. 1983. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequence. J. Mol. Biol. 170: 827-842.

Hou, R. F. and Y. C. Chao. 1980. Purification of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. Proc. Natl. Sci. Counc., R. O. C. 4: 411-414.

Jurkovicova, M., J. H. Van Touw, J. S. Sussenback and T. Terschegget. 1979. Characterization of the nuclear polyhedrosis virus of *Adoxophyes orana* and of *Barathra brassicae*. Virology 93: 8-19.

Knell, J. D. and M. D. Summers. 1984. A physical map for the *Heliothis zea* SNPV genome. J. Gen. Virol. 65: 445-450.

Kobayashi, M. and M. Nakagaki. 1984. Effect of dissolution conditions of polyhedral inclusion bodies in sodium carbonate solution on the yield of nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Appl. Ent. Zool. 19: 280-287.

Leary, J. J., D. J. Brigati and D. C. Ward. 1983. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. 80: 4045-4049.

Liu, H. S. and R. F. Hou. 1983. Electron microscopic observations on infection of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Natl. Sci. Counc., R. O. C. 7: 51-56.

Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, T. Chika, T. Horiuchi, K. Maekawa, K. Nakasuji, Y. Saeki, Y. Sato, K. Yamada and M. Furusawa. 1984. Characteristics of human α-interferon produced by a gene transferred by a baculovirus vector in the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Japan Acad. 60B: 423-426.

Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Sato and M. Furusawa. 1985. Production of human α-interferon in silkworm using a baculovirus vector. Nature 315: 592-594.

Mandel, M. and J. Marmur. 1968. Use of ultraviolet absorbance temperature profile for determinating the guanine plus cytosine content of DNA. *In:* "Methods in Enzymology" (Grossman, L. and K. Moldave, eds.), Vol. 12, Part B, pp. 195-206. Academic Press, N. Y.

Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. N. Y. 545 pp.

Maskos, C. B. and H. G. Miltenburger. 1981. SDS-PAGE comparative studies on the polyhedral and viral polypeptides of the nuclear polyhedrosis virus of *Mamestra brassicae*, *Autographa californica* and *Lymantria dispar*. J. Invertebr. Pathol. 37: 174-180.

McCarthy, W. J., W. E. Mercer and T. F. Murphy. 1978. Characterization of the DNA from four *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus isolates. Virology 90: 374-378.

Miller, L. K. and K. P. Dawes. 1978. Restriction endonuclease analysis for the identification of baculovirus pesticides. Appl. Environ. Microbiol. 35: 411-421.

Onodera, K., T. Komano, M. Himeno and F. Sakai. 1965. The nucleic acid of nuclear polyhedrosis virus of silkworm. J. Mol. Biol. 13: 532-539.

Smith, G. E. and M. D. Summers. 1979. Restriction maps of five *Autographa californica* MNPV variants, *Trichoplusia ni* MNPV, and *Galleria mellonella* MNPV DNAs with endonucleases Sma I, Kpn I, Bam HI, Sac I, Xho I, and Eco RI. J. Virol. 30: 828-838.

Smith, G. E. and M. D. Summers. 1982. DNA homology among subgroup A, B, and C baculoviruses. Virology 123: 393-406.

Southern, E. M. 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. Anal. Biochem. 100: 319-323.

Summers, M. D. and G. E. Smith. 1975. *Trichoplusia ni* granulosis virus granulin: A phenol-soluble phosphorylated protein. J. Virol. 16: 1108-1116.

Summers, M. D. and G. E. Smith. 1976. Comparative studies of baculovirus granulins and polyhedrins. Intervirology 6: 168-180.

Summers, M. D. and G. E. Smith. 1978. Baculovirus structural polypeptides. Virology 84: 390-402.

ANALYSIS OF DNA AND GENOMIC BANK CONSTRUCTION OF NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*, ISOLATED IN TAIWAN

S. W. Ma[1], Roger F, Hou[1,3], Y. W. Chen[1] and N. T. Hu[2]

Department of Entomology[1] and Agricultural Biotechnology Laboratory[2], National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC

The total DNA of nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*, (BmNPV) isolated in Taiwan was estimated to be ca. 120 kb as determined from the size of the DNA fragments generated by restriction endonuclease digestion. The GC content of BmNPV DNA was ca. 42.5% as calculated from its melting temperature of 71.3 C, its hyperchromicity being ca. 37.02%. The polyhedrin gene of BmNPV (Taiwan) was studied by constructing a genomic bank using phage EMBL3 after digesting with the restriction enzyme Sau 3AI. Among 218 recombinant phages obtained from hybridization with BmNPV (Japan) polyhedrin gene probe, 4 of them showed signal, indicating that they contain the polyhedrin gene. Single plaque formed by one recombinant phage as hybridized repeatedly with the probe was cloned for further study of the polyhedrin gene structure.

[3] To whom the reprint requests should be addressed.